

# 杂交鲆(牙鲆 × 夏鲆) 胚胎发育的初步观察

于道德<sup>1,2</sup>, 肖志忠<sup>2</sup>, 徐世宏<sup>2</sup>, 马道远<sup>2</sup>, 李 军<sup>2</sup>

(1. 中国科学院 研究生院, 北京 100039; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:**通过人工调控促使亲本牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) × 夏鲆 (*Paralichthys dentatus*) 的性腺发育, 人工干法授精获得杂交受精卵。杂交受精卵在温度为 16.5 ~ 17.5 °C, 光照为 100 ~ 400 lx, 微充气条件下孵化。对杂交鲆胚胎发育全过程进行连续观察并与牙鲆及夏鲆的胚胎发育进行比较。结果表明: 杂交鲆卵裂方式与其他大部分硬骨鱼类一样, 属于盘状卵裂。受精后经过 2 h 30 min 进入 2 细胞期, 7 h 45 min 进入囊胚期, 15 h 10 min 进入原肠胚阶段, 25 h 30 min 进入神经胚期, 49 h 左右进入尾芽期。授精后 63 h 左右发现初孵仔鱼, 68 h 左右 50 % 的仔鱼孵出。在杂交鲆的胚胎发育中, 主要有 2 个发育特征与母本类似而与父本不同: 视囊的出现要早于体节的分化; 孵化前, 仔鱼在卵膜内环绕卵黄囊不到 1 周。但是在其孵化时间上却与父本相似。

**关键词:** 牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*); 夏鲆 (*Paralichthys dentatus*); 杂交鲆; 胚胎发育

**中图分类号:** Q321.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2007)02-0055-06

杂交育种不仅能丰富遗传结构, 还能迅速和显著地提高杂种的生活力, 而获得杂种优势 (heterosis), 其目的在于通过亲本基因的分离和重组, 选出具有双亲优良性状的后代个体。鱼类杂交是鱼类育种基本手段之一, 已有 100 多年历史<sup>[1]</sup>。但大部分工作主要在淡水鱼类中展开, 成功的范例也不少, 如罗非鱼杂交<sup>[2]</sup>, 鲤鱼杂交<sup>[3]</sup>等。而在海水硬骨鱼类中, 尤其是鲆鲽类杂交报道并不多, 如国内石鲽与牙鲆的杂交<sup>[4]</sup>, 国外星斑川鲽与石鲽<sup>[5]</sup>的杂交, 星斑川鲽与美国的副眉鲽<sup>[6]</sup>的杂交等。

牙鲆和夏鲆分类地位相近, 均隶属于牙鲆属 (*Paralichthys*)。但地理分布不同, 牙鲆主要分布于渤海、黄海、东海、南海以及朝鲜、日本、俄国远东沿岸海区。夏鲆主要分布在中部大西洋东海岸。两者皆为暖温性底层鱼类, 具有生长速度快、养殖产量高等优点。作者进行的牙鲆 × 夏鲆的目的是希望能培育出具有明显杂交优势并适应国内海水养殖环境的优良杂交品种, 以满足市场需求, 丰富目前我国的海水养殖种类。作者仅对杂交鲆受精卵的胚胎发育过程进行分析和探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 亲鱼培育

母本: 三龄雌性牙鲆取自青岛市金瀛公司连三岛养殖场, 在性腺成熟前一个月进行温度和光照的人工调控及营养强化, 营养强化剂为青岛森淼公司的产品康宝 A, 用量为 15 g/kg, 饵料以冰冻小黄花鱼为主。养殖水体 10 m<sup>3</sup>, 日换水两个量程。水温 15 ± 1 °C, 光照强度为 200 lx 左右, 光照周期为 L : D = 16 h : 8 h。

父本: 二龄雄性夏鲆取自中国科学院海洋研究所鱼类组养殖基地。在性成熟前 3 个月进行相关的调控和营养强化, 营养强化剂为青岛森淼公司的产品康宝 A, 用量为 15 g/kg, 饵料包括: 冰冻玉筋鱼、鱿鱼等。前期每天投喂两次; 后期每天投喂一次。养殖水体 10 m<sup>3</sup>, 日换水两个量程。水温 18 ± 0.5 °C; 光照

收稿日期: 2005-08-22; 修回日期: 2006-09-05

基金项目: 山东省科技发展计划项目 (200505071)

作者简介: 于道德 (1978-), 男, 山东青岛人, 硕士, 研究方向: 海洋生物学, 电话: 0532-82898716, E-mail: wensente@163.com; 李军, 通讯作者, 研究员, 理学博士, E-mail: junli@ms.qdio.ac.cn

200 ~ 350 lx 左右;光照周期为 L D = 8 h 16 h。

## 1.2 人工授精与孵化

亲鱼经 MS-222 浸泡麻醉后(体积分数为  $10^{-5}$ ), 通过腹部挤压方法获得成熟的卵子和精液, 进行干法授精。于 2004 年 12 月 1 日、12 月 13 日及 2005 年 1 月 30 日完成 3 次杂交试验并在孵化网箱中进行孵化。

## 1.3 方法

人工授精后对受精卵进行连续取样, 利用体式显微镜及光学显微镜进行观察, 用目微尺测量受精卵的卵径, 油球径, 同时记录胚胎发育时序和形态特征, 并进行显微拍照。这里作者主要以 12 月 13 日取得的受精卵进行胚胎观察(实验温度: 16.5 ~ 17.5 )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 受精卵

受精卵是分离的浮性卵, 圆球形, 油球一个, 卵质均匀, 透明, 属端黄卵。卵膜光滑, 无龟裂纹, 围卵腔小。卵径  $1.000 \text{ mm} \pm 0.025 \text{ mm}$ , 油球径  $0.196 \text{ mm} \pm 0.012 \text{ mm}$

### 2.2 胚胎发育

杂交鲟的胚胎发育过程与亲本相似, 整个发育过程分为 6 个阶段, 即胚盘形成期、卵裂期、囊胚期、原肠期、神经胚期和器官形成期。杂交胚胎各阶段发育时间见表 1。并附图, 显示胚胎发育部分特征。

#### 2.2.1 胚盘形成阶段

杂交鲟受精卵的胚盘形成所经历的时间比母本长, 在 16.5 ~ 17.5 下, 胚胎在受精后约 1 h 卵膜举起, 从受精卵到胚盘形成历时 1.5 h 左右(图 1-1), 而作者观察的牙鲟胚胎在 15.4 ~ 16 下, 胚盘形成仅需 0.5 h。

#### 2.2.2 卵裂期

杂交鲟受精卵的分裂方式与亲本一样, 属盘状卵裂。受精后 2 h 30 min 开始第一次分裂, 分裂面与胚盘底面垂直(即经线裂), 将胚盘分为两个大小几乎相同的分裂球而达到 2 细胞期(图 1-2); 受精后 3 h 5 min, 出现第二次卵裂, 分裂面仍与胚盘底面垂直, 同时垂直与第一次分裂沟, 形成 4 个大小相似的分裂球, 为 4 细胞期(图 1-3)。又经过 30 min 后, 发生的

第三次卵裂形成了两条分裂沟(仍然为经裂), 平行于第一次卵裂, 垂直于第二次卵裂沟, 而形成 8 个大小相似的分裂球, 为 8 细胞期(图 1-4)。受精后 4 h 15 min

表 1 杂交胚胎发育时序

Tab. 1 Time-table of hybrid embryonic development

发育时期	受精后时间(h)	图序
1. 胚盘形成阶段		
受精卵	0	
卵膜举起	0.5	
胚盘形成	1.5	图 1-1
2. 卵裂期		
2 细胞	2.5	图 1-2
4 细胞	3.08	图 1-3
8 细胞	3.58	图 1-4
16 细胞	4.25	图 1-5
32 细胞	5	图 1-6
64 细胞	5.58	图 1-7
3. 囊胚期		
高囊胚	7.75	图 1-8
低囊胚	12.17	图 1-9
4. 原肠期		
原肠早期	15.17	图 1-10, 1-11
原肠中期	19	图 1-12, 1-13
原肠晚期	24	图 1-14
5. 神经胚期		
神经板	25.5	
神经沟	26.67	
神经管	27.67	
6. 器官形成期		
视囊期	28.5	图 1-15
胚孔封闭期	31	图 1-16
听板期	36	图 1-18
尾芽期	49	图 1-20
肌肉效应期	53	图 1-21
心跳期	54	图 1-22
即将孵化	65	图 1-23
破膜孵出	68	图 1-24

注: 培育水温 16.5 ~ 17.5

进行第四次卵裂,形成均匀排列的4排16个分裂球而进入16细胞期(图1-5)。受精后5h进行第五次卵裂,进入32细胞(图1-6)。在32细胞64细胞时(图1-7)开始第一次纬线裂(此时距受精时间为5h35min),细胞分为两层。以后的卵裂由经线裂和纬线裂交替进行,形成具有多层结构的细胞团。整个卵裂期历时6h左右。

### 2.2.3 囊胚期

受精7h45min后,细胞继续分裂,卵裂球越来越小,囊胚腔开始形成,进入囊胚期。此时的细胞团在卵内隆起最高,为高囊胚(图1-8)。随着胚胎的进一步发育,细胞间的界线变得不明显,细胞团的隆起部分开始下降,并伴随着细胞的下包,进入低囊胚(图1-9)。本阶段历时5h左右。

### 2.2.4 原肠期

主要通过胚盘细胞的下包、内卷、内移等方式迁移到囊胚内部形成原肠,同时进行胚层的分化,内卷的部分即胚体的中内胚层。在受精后15h10min,由于边缘部的细胞运动缓慢,随着细胞的下包而使这部分胚层变厚形成胚环,胚胎发育进入原肠早期(图1-10,1-11);在受精后19h,胚环的预定尾端细胞向中线集中而进一步增厚形成胚盾,进入原肠中期(图1-12,1-13);当胚环及胚盾继续下包至3/4~4/5处时,进入原肠晚期(图1-14)。本阶段历时10h左右。

### 2.2.5 神经胚期

随着胚环的继续下包,在受精后25h30min,胚盾不断向前形成神经板,胚胎发育进入神经胚期。受精后26h30min,神经板的两侧加厚隆起形成神经褶,而相对在胚体中间形成神经沟。受精后27h40min,神经沟从胚体中后部开始愈合形成神经管,后逐渐向两端推进,其先愈合的部分先形成体节。整个神经胚期的发育时间较短,经历约4h左右。

### 2.2.6 器官形成期

受精后28h30min,胚体头突明显,同时形成眼泡(即眼的原基),为视囊期(图1-15);同时克氏囊出现。在胚孔即将封闭前期,胚体从中部开始分节。受精后31h左右,胚孔封闭(图1-16),此时胚体完全形成,肌节数为3对。杂交胚胎此阶段的发育时序与母本牙鲆相同,即在胚孔关闭前期,胚胎先出现眼泡及

克氏囊,而后胚体才开始分节。相同的报道还见于圆斑星鲽<sup>[7]</sup>及石鲽<sup>[8]</sup>;而父本夏鲆的相关发育时序为先形成体节后产生眼泡<sup>[9]</sup>,类似的发育时序还见于真鲷(笔者观察)及大口胭脂鱼<sup>[10]</sup>等,即先形成体节后产生眼泡。

受精后33h,体节形成6~8对,克氏囊更加明显,突出。受精后36h,体节12对左右,胚体背部出现黑色素(图1-17),卵膜上也出现少量黑色素,皆呈点状分布,同时第一节肌节前开始形成听板(图1-18)。受精后42h,可见油球上的色素分布,胚胎开始形成心脏原基,克氏囊消失,胚体绕卵黄囊近2/3。受精后42h30min,此时肌节数为22~24对;可见脊索中侧部出现零星的黄色素(图1-19),此时黑色素向胚体其他部分扩散,其形状也由点状逐渐变成菊花状。受精后49h左右,尾部游离于卵黄膜,并已经形成尾鳍膜,此时为尾芽期(图1-20)。受精后53h,肌节形成30对左右,可见胚体的间歇抽搐,此时为肌肉效应期(图1-21),尾部进一步游离卵黄膜。此后约1h,心脏开始跳动,频率为40~54次/min,围心腔清晰可见(图1-22)。尾部游离卵黄膜的部分亦增大。

### 2.2.7 孵化期

受精后56h,伴随着肌体的间隔颤动,游离卵黄膜的尾部逐渐增长,并且胚体抽搐的幅度和频率也逐步增加(图1-23)。受精后63h左右,仔鱼开始孵出(图1-24),孵出前胚体在卵膜内环绕不到1周,与母本牙鲆相同。而文献<sup>[9]</sup>和作者在父本夏鲆胚胎发育的观察中皆表明,孵化前夏鲆胚体在卵膜内环绕要超过1周。

### 2.2.8 出膜方式

出膜前胚体在卵膜内剧烈颤动,一般是头部先出膜。但观察中仍发现少量的尾部先破膜的仔鱼,或通过仔鱼胚体的甩动,脱离卵壳;或没有脱离卵壳而导致死亡。从开始出膜到半数孵化约历时5h左右。

### 2.2.9 孵化时间

作者在2005年1月30日进行了牙鲆与杂交鲆胚胎发育的对照观察(温度15.4~16.0℃,未发表),结果发现杂交鲆的胚胎从受精到孵化所需的时间为76h左右,牙鲆为64h,夏鲆为77h<sup>[11]</sup>,并与其父本

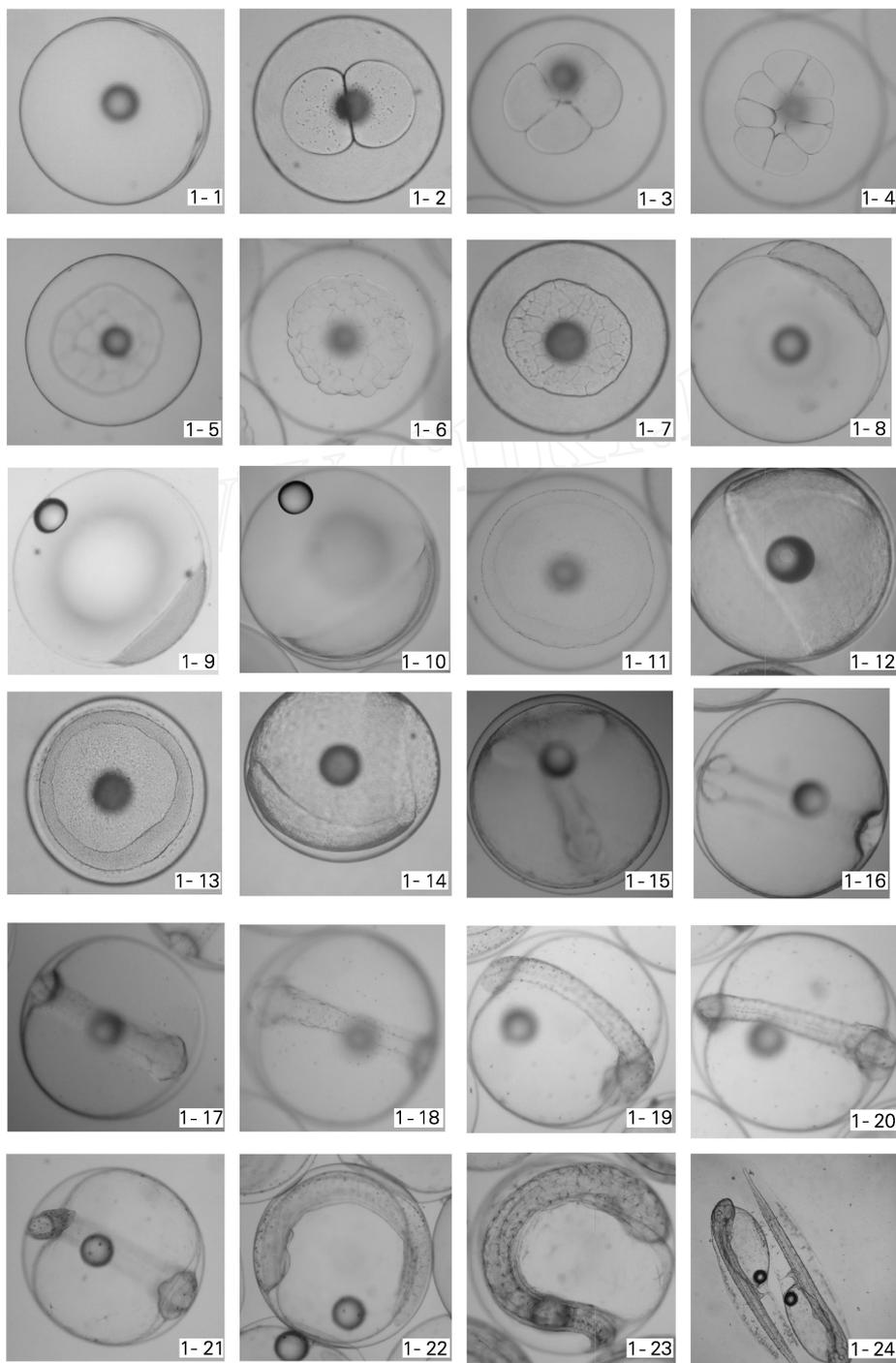


图1 牙鲆 × 夏鲆 杂交受精卵的胚胎发育

Fig. 1 The embryonic development of fertilized eggs (Japanese flounder × summer flounder)

1-1. 胚盘形成;1-2. 2细胞期;1-3. 4细胞期;1-4. 8细胞期;1-5. 16细胞期;1-6. 32细胞期;1-7. 64细胞期;1-8. 高囊胚;1-9. 低囊胚;1-10. 原肠早期;1-11. 原肠早期(侧观);1-12. 原肠中期;1-13. 原肠中期(侧观);1-14. 原肠晚期;1-15. 视囊期;1-16. 胚孔关闭期;1-17. 黑色素出现;1-18. 听板期;1-19. 黄色素出现;1-20. 尾芽期;1-21. 肌肉效应期;1-22. 心跳期;1-23. 即将孵化;1-24. 初孵仔鱼;1-25. 夏鲆孵化前期

1-1. blastodisc forming;1-2. 2 cell stage;1-3. 4 cell stage;1-4. 8 cell stage;1-5. 16 cell stage;1-6. 32 cell stage;1-7. 64 cell stage;1-8. high blastula stage;1-9. low blastula stage;1-10. early gastrula stage;1-11. early gastrula stage(lateral);1-12. mid gastrula stage;1-13. mid gastrula stage(lateral);1-14. late gastrula stage;1-15. optic vesicle stage;1-16. blastopore closure stage;1-17. black melanophore appearance;1-18. otic vesicle stage;1-19. xanthophore appearance;1-20. tail-bud stage;1-21. embryo movement stage;1-22. heart-beating stage;1-23. pre-hatching stage;1-24. hatching larva;1-25. pre-hatching stage of summer flounder

胚胎的发育时间相近,而并非简单的介于两者之间。然而已经进行的大量的杂交胚胎发育的研究表明,杂交胚体的孵化时间皆偏于母本。如夏仕玲<sup>[12]</sup>在26~29下进行的金鱼与泥鳅的正交和杂交实验:金鱼胚胎的孵化时间为 $2\ 125\ \text{min} \pm 9\ \text{min}$ ,泥鳅为 $1\ 400\ \text{min} \pm 8\ \text{min}$ 。金鱼与泥鳅的杂交胚胎为 $2\ 175\ \text{min} \pm 9\ \text{min}$ ,金鱼与泥鳅的杂交胚胎为 $1\ 470\ \text{min} \pm 8\ \text{min}$ 。马梁等<sup>[13]</sup>进行的鲢状黄姑鱼与大黄鱼杂交实验:鲢状黄姑鱼与大黄鱼杂交胚胎的孵化时为 $2\ 394\ \text{min}$ (17~20),母本鲢状黄姑鱼胚胎为 $2\ 382\ \text{min}$ (17~20),大黄鱼为 $3\ 015\ \text{min}$ (18左右)。夏仕玲<sup>[12]</sup>将上述现象解释为“偏母遗传”现象,即杂种的胚胎发育的速度受到细胞质因子的调控。而杂交鲆的胚胎发育时间的偏向父本的现象,是否受到环境因素的影响,或真正是在遗传上受到父本基因的调控而延迟其孵化的速率,还需要进一步的观察和探讨。

#### 参考文献:

[1] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社, 1999.  
 [2] 王楚松,夏德全,胡玫,等. 奥尼鱼杂种优势的利用[J]. 淡水渔业, 1989, 6: 13-15.  
 [3] 楼允东,孙景春. 江西三种红鲤起源与遗传多样性研究的进展[J]. 水产学报, 2001, 25(6): 570-575.  
 [4] 王新成,尤锋,倪高田,等. 石鲈与牙鲆人工杂交的

研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(1): 1-4.  
 [5] Morrow J E. The freshwater fishes of Alaska [M]. Alaska :Alaska Northwest Publishin, 1980. 248.  
 [6] Lamb A, Edgell P. Coastal fishes of the Pacific north - west [M]. Canada: Harbour Publishing Co Ltd, 1986. 224.  
 [7] 王开顺,张志峰,康庆浩,等. 圆斑星鲈胚胎及仔鱼发育的观察[J]. 中国水产科学, 2003, 10(6): 451-456.  
 [8] 朱杰,张秀梅,高天翔,等. 大菱鲆早期变态发育和体表黑色素细胞形态学观察[J]. 水产学报, 2002, 26(3): 193-200.  
 [9] Gabriela M M, Jessica A B. Embryonic and larval staging of summer flounder (*Paralichthys dentatus*) [J]. *Journal of Morphology*, 2003, 255: 162-176.  
 [10] 王佳喜,胡少华,管敏,等. 美国大口胭脂鱼胚胎发育研究[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(2): 298-303.  
 [11] Johns D, Howell W, Klein-MacPhee. Yolk utilization and growth to yolk-sac absorption in summer flounder (*Paralichthys dentatus*) larvae at constant and cyclic temperature [J]. *Marine Biology*, 1981, 63: 301-308.  
 [12] 夏仕玲. 鱼类卵细胞质对胚胎发育速度的调控[J]. 珠江水产, 1992, 18: 65-68.  
 [13] 马梁,王军,陈武各,等. 鲢状黄姑鱼与大黄鱼人工杂交子代的胚胎发育[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(3): 378-382.

## Preliminary observation on the embryonic development of hybrid flounder ( *Paralichthys olivaceus* × *Paralichthys dentatus* )

YU Dao-de<sup>1,2</sup>, XIAO Zhi-zhong<sup>2</sup>, XU Shi-hong<sup>2</sup>, MA Dao-yuan<sup>2</sup>, LI Jun<sup>2</sup>

(1. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 2. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Aug. 22, 2005

**Key words:** Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*); summer flounder (*Paralichthys dentatus*); hybrid flounder; embryonic development

**Abstract:** The gonadal development and maturation of the broodstock Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and summer flounder (*Paralichthys dentatus*) were induced by environmental manipulation. The fertilized eggs of hybridisation were acquired by artificial dry fertilization and hatched on the condition of water temperature: 16.5 ~ 17.5 °C, intensity of illumination: 100 ~ 400 lx, and subtle aeration. The fertilized eggs are transparent and buoyant. The results show that the embryos of hybrid flounder belong to telolecithal egg and discoidal cleavage. The blastodisc appeared in 1.5 hours after fertilization. Eggs came into the cleavage stage in 2.5 hours, blastula stage in 7.75 hours, gastrula stage in 15.17 hours, neural plate stage in 25.5 hours and organogenesis stage in 28.5 hours after fertilization. At the time of 68 hours after that of fertilization, fifty percent of embryos hatched. There were two major developmental characteristics similar to that of the female parent other than that of the male parent: optic vesicle stage prior to the formation of the somites; the larval wrapped the yolk sac within one perimeter before hatching. Interestingly, the incubating period of the eggs was similar to that of the male parent, and different from that of the hybrid eggs of other fish species whose incubating period was similar to that of the female parent.

(本文编辑:刘珊珊)